

Existencia/ausencia de los genes *stx2e* y *f18* en aislados de *Escherichia coli* de cerdos libres de diarrea

Existence/absence of the *stx2e* and *f18* genes in *Escherichia coli* isolates from diarrhea-free pigs

Alejandra Flores M.¹, Luis Alvarez V.¹, Joel Palomino-Farfán¹,
Juan Siuce M.¹, Sonia Calle E.^{1*}

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar aislados de *Escherichia coli* para comprobar la presencia o ausencia de los genes *f18* y *stx2e*. Se estudiaron 186 aislados obtenidos de cerdos menores de 50 días de edad que no tenían diarrea al momento de la toma de muestra. Los animales eran originarios de cuatro granjas de crianza tecnificada situadas en la región Lima. El muestreo fue hecho en 2019 como parte de un estudio preliminar empleando hisopados rectales. Se utilizó un kit de purificación comercial para la extracción del ADN y un protocolo de PCR convencional para la detección de los genes. En ninguno de los *E. coli* aislados de estos lechones pudo detectarse producto de PCR para *stx2e* ni *f18*.

Palabras clave: enfermedad de los edemas, *Escherichia coli*, cerdos, *f18*, *stx2e*

¹ Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

* Autor de correspondencia: Sonia Calle E., scallee@unmsm.edu.pe

Recibido: 10 de noviembre de 2023

Aceptado para publicación: 5 de septiembre de 2024

Publicado: 31 de octubre de 2024

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate *Escherichia coli* isolates for the presence or absence of the *fl8* and *stx2e* genes. In total, 186 isolates obtained from piglets under 50 days of age that did not have diarrhoea at the time of sampling were studied. The animals were from four high-tech breeding farms located in the Lima region. Sampling was done in 2019 as part of a preliminary study using rectal swabs. A commercial purification kit was used for DNA extraction and a conventional PCR protocol was used for gene detection. No PCR product for *stx2e* or *fl8* could be detected in any of the *E. coli* isolated from these piglets.

Key words: edema disease, *Escherichia coli*, pigs, *fl8*, *stx2e*

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria presente en la microbiota intestinal habitual del humano y animales endotermos (OMS, 2018). Aunque *E. coli* no es usualmente descrita como bacteria patógena, existen cepas con la capacidad de causar enfermedad, como su variante shigatoxigénica productora de la toxina Shiga 2e (Stx2e-STEC) (Moredo, 2012; Figueroa, 2016).

Stx2e-STEC posee genes que codifican para sus principales factores de virulencia, una toxina (Shiga 2e) y una fimbria (F18), involucradas en la fisiopatología de la enfermedad del edema o de los edemas (EE), afección descrita en porcinos (Fairbrother, 2023). El uso de antibióticos está descrito para controlar la EE, pero el inadecuado empleo de estos agrava la creciente resistencia antimicrobiana (Arrunátegui, 2016), por lo que resulta crucial buscar alternativas preventivas como aquellas basadas en la inmunización de los animales.

Autores como Parma *et al.* (2000), Souza *et al.* (2001) y Cheng *et al.* (2006), así como Vu-Khac *et al.* (2007), Moredo *et al.* (2012), Meng *et al.* (2014) y Baldo *et al.* (2020) identificaron los genes de Stx2e-STEC

en ejemplares con signos clínicos sugestivos de la EE y en animales aparentemente sanos. Estos estudios tienen importancia epidemiológica, sanitaria y económica. Los resultados pueden variar entre países y por la condición clínica individual, así como también se pueden ver influenciados por la manera de obtener la muestra y por el método de detección (Meng *et al.*, 2014).

Si bien casos sugerentes de la EE han sido identificados en algunas granjas porcinas del país, se han detectado los dos genes en estudio en aislados de cerdos con manifestación de diarrea (F. Ramos, datos no publicados). Por otro lado, el cerdo sin manifestación clínica de diarrea podría actuar como potencial portador de la EE (Moredo, 2012).

La falta de publicaciones o estudios que expongan la presencia de cepas de Stx2e-STEC asociadas a la EE en centros de producción porcina a nivel nacional obstaculiza la instauración de planes de prevención que reduzcan las pérdidas económicas generadas por la alteración del estatus sanitario. En relación con lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar la posible presencia del gen *stx2e* y del gen *fl8* en aislados de *E. coli*, provenientes de cerdos libres de diarrea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Experimental

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Perú. Se evaluaron 186 aislados de *E. coli* procedentes de cerdos menores de 50 días de edad sin manifestación clínica de diarrea, pertenecientes a cuatro granjas de crianza tecnificadas de la zona de Lima. La toma de muestras se hizo mediante hisopado rectal individual aleatorio en un estudio previo (octubre-diciembre, 2019).

El estudio fue de tipo descriptivo y de corte transversal. Para la determinación del tamaño muestral se utilizó la ecuación para población desconocida (Dohoo *et al.*, 2003), con un 95% de nivel de confianza ($z=1.96$), 1.6% de prevalencia mínima esperada y 0.018% de precisión (Baldo *et al.*, 2020). El tamaño de muestra resultante fue de 186.

Extracción de ADN

Para reactivar las de cepas de *E. coli*, los aislados se inocularon en agar de tripticasa de soya (TSA) y Agar MacConkey (MC), e incubados a 37 °C por 24 h. Posteriormente, se tomaron dos colonias que fueron inoculadas en viales con caldo LB (1.5 ml) e incubadas por 24 h a 37 °C hasta observar turbidez indicativa de crecimiento bacteriano. Para

finalizar, se utilizó el kit GeneJET™ Genomic DNA Purification (Thermo Scientific) para la extracción del ADN. Se preservó el ADN a -20 °C.

Detección de *stx2e* y *f18* por PCR

Con PCR convencional se realizó la detección de cada uno de los genes, *stx2e* y *f18*, haciendo uso del ADN obtenido en el paso previo como templado. El protocolo empleado fue resultado de una estandarización de lo establecido por Boerlin *et al.* (2005) y Casey y Bosworth (2009). Los detalles de presentan en el Cuadro 1.

Identificación del Gen *stx2e*

Se ajustó el protocolo con una concentración de 1X de DreamTaq Buffer (incluye $MgCl_2$ a 2 mM), 0.15 μ M de cada cebador y 0.2 mM de dNTPs; asimismo, 0.2 μ l de DreamTaq DNA polymerase, 1 μ l de ADN y se incluyó agua ultrapura para llegar al volumen final de 20 μ l. Además de las muestras en estudio, se consideraron como control blanco al agua ultrapura, a la cepa P5A como control positivo y a la cepa ATCC 25922 como control negativo.

En el termociclado se consideró: 95 °C por 15 min para la desnaturalización inicial; seguido de 35 ciclos de 95 °C por ciclo de desnaturalización por 1 min, 55 °C de hibridación por 1 min y la elongación a 72 °C por 1 min; cerrando con una elongación final a 72 °C por 10 min.

Cuadro 1. Cebadores utilizados para la determinación de la presencia de los genes *f18* y *stx2e*

Cebador	Secuencia 5' → 3'	Producto	Referencia
F18 forward	TGG TAA CGT ATC AGC AAC TA	313 pb	
F18 reverse	ACT TAC AGT GCT ATT CGA CG		
Stx2e forward	AAT AGT ATA CGG ACA GCG AT	733 pb	Boerlin <i>et al.</i> (2005)
Stx2e reverse	TCT GAC ATT CTG GTT GAC GC		

Para la electroforesis se fabricó un gel con 1.5% de agarosa en buffer TBE 0.5X y las condiciones fueron de 90 v, 90 mA y 90 min. Se usó *Blue/Orange 6X Loading Dye*, 1 µl de tinte por 5 µl de producto para teñir los amplicones obtenidos del PCR. El tamaño de pares de bases se comprobó utilizando un marcador de peso molecular o *ladder* (100bp *Opti-DNA Marker*). Posteriormente, se preparó una solución buffer TBE al 0.5X mezclado con *Diamont™ Nucleic Acid Dye* a 1X y se sumergió el gel durante 20 min. Con un transiluminador de luz azul se visualizó el tamaño de las bandas obtenidas.

Identificación del Gen fl8

Se ajustó el protocolo con una concentración de 1X de *DreamTaq Buffer* (incluye $MgCl_2$ a 2 mM), 0.15 iM de cebador forward y 0.15 µM de cebador reverse y 0.2 mM de dNTPs; 0.2 µl de *DreamTaq DNA polymerase*, 1 µl de ADN y con agua ultrapura para completar los 20 µl de volumen final. Además de las muestras en estudio, se consideraron como control blanco al agua ultrapura, a la cepa P2A como control positivo y a la cepa ATCC 25922 para control negativo.

En el termociclado se consideró: 95 °C por 15 min para la desnaturalización inicial; siguiendo 30 ciclos. En cada ciclo desnaturalización a 95 °C por 45 s, hibridación a 55 °C por 45 s y elongación a 72 °C por 45 s, con una elongación final por 10 min a 72 °C.

Para la electroforesis se fabricó un gel con 1.5% de agarosa en buffer TBE 0.5X, con condiciones de 90 v, 90 mA y 90 min. Se usó *Safe-Green™*, 1 µl de tinte por cada 5 µl de producto para teñir los amplicones obtenidos del PCR. El tamaño de pares de bases se comprobó utilizando un *ladder* (100bp *Plus Opti-DNA Marker*). Con un transiluminador de luz azul se visualizó el tamaño de las bandas obtenidas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo por finalidad evaluar la posible existencia del gen *stx2e* y del gen *fl8* en aislados de *E. coli* de cerdos menores de 50 días de vida y sin diarrea. No se detectó la presencia del gen *stx2e* ni del gen *fl8* en los 186 aislados de *E. coli* bajo estudio; por tanto, la frecuencia resultante fue de 0% (0/186).

Parma *et al.* (2000) estudiaron por vez primera al gen *stx2e* en Argentina en cerdos sin diarrea sin llegar a detectar positivos. La similitud con estos resultados podría deberse a la edad de los animales muestreados, debido a que dichos autores incluyeron lechones libres de diarrea (0/19; 0%) y sus respectivas madres (0/20; 0%), cuyas edades no se encuentran dentro del grupo etario susceptible, que son los lechones posdestete (Fairbrother, 2023). Por su parte, Moredo (2012) tampoco halló a *stx2e* en lechones sin diarrea de 21 ± 3 días de edad, en tanto que los encontró en animales de más edad (69/986; 7%), sugiriendo que la posibilidad de detectar al gen aumenta en edades susceptibles, incluso cuando son animales aparentemente sanos.

En el posdestete, los lechones son más vulnerables a la colonización de STEC por el estrés asociado a la transición de un alimento a otro (Germán *et al.*, 2005), así como más propensos a la EE por la expresión de ciertos receptores, específicamente para F18, que se incrementa posterior a los 21 días de vida, periodo de destete y más estrés (Fairbrother, 2023). Es así como la baja expresión de receptores restringe la unión de la bacteria a los enterocitos, y al no multiplicarse y liberar altamente la toxina Stx2e, baja la probabilidad de hallar al gen o que la enfermedad se manifieste.

Vu-Khac *et al.* (2007) también estudiaron animales aparentemente sanos menores de 14 días de edad sin encontrar positivos ni

para *stx2e* ni *f18* (0%), siendo nuevamente la edad un factor crucial para explicar en parte los hallazgos negativos en cerdos sin diarrea. Los autores también estudiaron lechones con diarrea de la misma edad, hallando una prevalencia de 4% (9/220) para *stx2e* y de 9% (20/220) para el gen *f18*, por lo que, si bien la nula o baja manifestación de la EE podría estar influenciada por la edad, aún en lechones lactantes podrían detectarse a los genes *stx2e* y *f18*, siendo la diarrea un signo clínico vinculado a esta posibilidad.

Por otro lado, Baldo *et al.* (2020) evaluaron a *stx2e* en 171 porcinos sanos, detectando al gen en tres de ellos que se encontraban en la etapa de engorde (1.75%). Asimismo, en los aislados positivos para *stx2e* evaluaron la presencia de *f18*, sin obtener resultados positivos (0/3; 0%). Esto podría indicar que aún en casos sugerentes de EE se puede encontrar cepas STEC *stx2e* positivas, pero *f18* negativas (Cheng *et al.*, 2005; Barth *et al.*, 2007; Martineau *et al.*, 2018). Esto, asimismo, es indicativo de que detectar positivos al gen *f18* es menos probable que la frecuencia para *stx2e*, siendo otro punto que explicaría los casos negativos a *f18* en este estudio.

En el presente estudio solo se empleó el muestreo por hisopado rectal. Meng *et al.* (2014) mencionan que la prevalencia de STEC en cerdos sanos puede variar según la zona de muestreo, siendo casi 4.4 y 2.5 veces mayor en muestras del contenido del colon que del intestino delgado y heces, respectivamente. Es así, que el punto anatómico donde se obtuvieron las muestras de este estudio podrían haber afectado la no obtención de resultados positivos.

CONCLUSIÓN

Asumiendo un 1.6% de nivel de detección límite, no se encontraron positivos para el gen *stx2e* ni para *f18* en *E. coli* aislados de cerdos sin manifestación clínica de dia-

rrrea de hasta 50 días de vida en granjas tecnificadas de Lima.

LITERATURA CITADA

1. **Arrunátegui V. 2016.** Frecuencia de colibacilosis por *Escherichia coli* enteroinvasivo en *Suis scrofa domestica* «porcino» procedentes del sector La Merced, distrito Laredo. Tesis de Biólogo-Microbiólogo. Trujillo, Perú: Univ. Nacional de Trujillo. 29 p.
2. **Baldo V, Salogni C, Giovannini S, D'Incau M, Boniotti M, Birbes L, Pitozzi A, et al. 2020.** Pathogenicity of Shiga Toxin Type 2e *Escherichia coli* in pig colibacillosis. *Front Vet Sci* 7: 1-10. doi: 10.3389/fvets.2020.545818
3. **Barth S, Tscholshiew A, Menge C, Weiss R, Baljer G, Bauerfeind R. 2007.** Virulence and fitness gene patterns of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from pigs with edema disease or diarrhea in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 120: 307-316.
4. **Boerlin P, Travis R, Gyles C, Reid-Smith R, Janecko N, Lim H, Nicholson V, et al. 2005.** Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Appl Environ Microbiol* 71: 6753-6761. doi: 10.1128/AEM.71.11.6753-6761.2005
5. **Casey TA, Bosworth BT. 2009.** Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine. *J Vet Diagn Invest* 21: 25-30. doi: 10.1177/1040638-70902100104
6. **Cheng D, Sun H, Xu J, Gao S. 2005.** Prevalence of fimbrial colonization factors *F18ab* and *F18ac* in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema and/or diarrhea in China. *Vet Microbiol* 110: 35-39. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.06.006

7. **Cheng D, Sun H, Xu J, Gao S. 2006.** PCR detection of virulence factor genes in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema disease and/or diarrhea in China. *Vet Microbiol* 115: 320-328. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.02.013
8. **Dohoo IR, Martin W, Stryhn H. 2003.** *Veterinary epidemiologic research.* Charlottesville, USA: Atlantic Veterinary College. 706 p.
9. **Fairbrother JM. 2023.** Edema disease in pigs. MSD manual [Internet]. Disponible en: <https://www.msddvetmanual.com/generalized-conditions/edema-disease/edema-disease-in-pigs>
10. **Figuroa M. 2016.** Manual de enfermedades de los cerdos. Tesina de Médico Veterinario Zootecnista. Toluca: Univ Autónoma del Estado de México. 285 p.
11. **Germán C, Camacho J, Gallegos J. 2005.** Producción de cerdos. México: COLPOS. Manual del participante. 82 p.
12. **Martineau G, Amenna N, Waret A. 2018.** Enfermedad de los edemas. Cuadro clínico y lesional y fisiopatología. IDT [Internet]. Disponible en: https://www.shigatoxin.com/assets/res/downloads/Monografico_STEC_SUIS_2018.pdf
13. **Meng Q, Bai X, Zhao A, Lan R, Du H, Wang T, Shi C, et al. 2014.** Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pigs in China. *BMC Microbiol* 14: 1-14.
14. **Moredo F. 2012.** Prevalencia de *Escherichia coli* enterotoxigénico y *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en cerdos sin manifestación clínica de diarrea de la provincia de Buenos Aires. Tesis Doctoral. La Plata, Argentina: Univ. Nacional La Plata. 246 p.
15. **Moredo FA, Cappuccio JA, Insarralde L, Perfumo CJ, Quiroga MA, Leotta GA. 2012.** Caracterización genotípica de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de cerdos con diarrea posdestete y enfermedad de los edemas. *Rev Argent Microbiol* 44: 85-88.
16. **[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2018.** *E. coli.* [Internet]. Disponible en: <https://www.who.int/es/newsroom/fact-sheets/detail/e-coli>
17. **Parma A, Sanz M, Viñas M, Cicuta M, Blanco J, Boehringer S, Blanco M. 2000.** Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. *Vet Microbiol* 72: 269-276. doi: 10.1016/s0378-1135(99)00167-4
18. **Souza A, Freesz G, Amante M, Guimarães B, da Silva D. 2001.** *Escherichia coli* strains from edema disease: O serogroups, and genes for Shiga toxin, enterotoxins, and F18 fimbriae. *Vet Microbiol* 80: 227-233. doi: 10.1016/s0378-1135(01)00316-9
19. **Vu-Khac H, Holoda E, Pilipcinec E, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, et al. 2007.** Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. *Vet J* 174: 176-187. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.05.019